

경주개(동경이)의 혈통확인을 위한 microsatellite DNA 다형성 분석

이은우 · 최석규¹ · 조길재*

경북대학교 수의과대학, ¹서라벌대학 생명보건학부

Received March 31, 2008 / Accepted May 8, 2008

Analysis of Microsatellite DNA Polymorphisms for Pedigree Verification in Kyungju Dog (Dongkyung-i). Eun-Woo Lee, Seog-Gyu Choi¹ and Gil-Jae Cho*. *College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, ¹Department of Planning Office School of Life-Health, Sorabol College, Kyungju 780-711, Korea* - In this study, we analyzed the microsatellite DNA polymorphisms for pedigree verification in Kyungju dog (Dongkyung-i) which is one of the Korean breed dogs. A total of 51 Dongkyung-i samples were genotyped using 8 microsatellite markers. The number of alleles observed at single locus ranged from 4 to 12, with average number of alleles per locus of 8.5. The expected heterozygosity and polymorphic information contents (PIC) values of the 8 microsatellite loci were 0.6162~0.8746 (mean 0.7587) and 0.5461~0.8512 (mean 0.7167), respectively. Of the 8 markers, PEZ3, PEZ6, PEZ12 and FHC2054 loci had relatively high PIC values (>0.7) in Dongkyung-i. Pedigree verification of Dongkyung-i was analyzed based on alleles observed. The results of the parentage testing were noted significant differences compared with breeders. These results show basic information of conservation and research in Dongkyung-i, and further studies of genetic pedigree in Dongkyung-i will be needed.

Key words : Dongkyung-i, microsatellite DNA polymorphisms, pedigree verification.

서 론

토종개란 그 지역의 기후풍토에 적응하며 오랫동안 살아남은 개 집단을 총칭하는 것으로 우리나라 토종개의 범주에는 한반도에서 오랜 기간 동안 적응하며 살아남은 온갖 형태의 개가 포함될 수 있다. 그러나 기르던 장소와 환경에 따라 외국 개들의 혈통에 오염될 수도 있지만 문화적인 중심지에서 멀어질수록 오래된 고유 혈통이 변화되지 않고 원래의 모습대로 남아 있을 수 있을 것이다. 그 중에서 대표적인 국내의 토종개는 천연기념물인 진돗개와 삼살개가 있고 미지정 축양동물인 제주개, 동경이, 불개 등이 있다[8]. 경주개(일명 동경견(東京犬)이라는 용어에서 유래된 것으로 추정된다. 현재 꼬리 없는 개인 "동경이"를 지칭하는 용어는 지방에 따라 다양하다. 영남지방에서는 동경견, 동경개, 동가이, 동갱이, 등신개라고 하며 호남지방에서는 땡견, 땡갱이, 땡갱이, 동동이, 땡땡이, 동강이, 중부지방에서는 동동개, 충청지방에서는 땡구로 불리기도 한다[4].

국제동물유전학회 개 분과위원회에서는 개의 개체식별 및 친자확인을 위한 microsatellite DNA 분석기법을 표준화하기 위해 국제 개 비교동정시험을 실시하고 있으며, American Kennel Club에서는 전 세계 개 품종의 절반인 151개 품종의

개를 등록하고 있다[9]. 국내에서 사육 중인 개의 개체식별 및 친자확인을 위한 microsatellite DNA형에 관한 분석은 주로 연구 위주로 실시하고 있다[1,2,3,10]. 그러나 분석기법의 표준화를 위한 국제동물유전학회(ISAG) 개 비교동정시험(Canine Comparison Test)에 참가하는 검사기관의 부재로 인해 감정 효율의 저하 및 토종개 고유의 유전자원이 소실될 수 있으므로 이러한 국내 토종개의 고유한 유전자원을 보호 육성하고 하나의 품종으로 확립하기 위해서는 무엇보다도 정확한 유전자 분석에 의한 혈통 관리가 이루어져야 한다.

Microsatellite의 다형성은 기본적인 반복 단위의 반복수에 의해 형성되며 이것은 부모로부터 반반씩 물려받는다. 멘델의 유전법칙에 따라 유전된다. 염색체 DNA 중에 고르게 분포된 microsatellite locus가 개체 간 다양한 변이를 보임으로써 개 품종간 유연관계 분석에 쓰일 뿐만 아니라 염색체 지도 작성의 주요한 marker로서 알려져 있다.

다른 동물과 마찬가지로 외국의 여러 나라에서는 개의 혈통 보존 및 개량을 목적으로 친자확인을 위한 DNA형 감정을 실시하거나 연구 중에 있지만[5], 국내의 경우 타 품종에 비해 개의 혈통보존 및 개량을 위한 혈통등록에 관한 연구는 일부 품종에 한해 보고된 바 있으나[10] 경주지방을 중심으로 사육되고 있는 경주개(동경이)에 대한 유전학적 연구는 보고된 바 없다.

멸종 위기에 놓여 있는 동경이의 올바른 혈통 보존을 위해서는 먼저 현재 사육되고 있는 동경이의 올바른 혈통을 분석한 후 정확한 번식 등록과 혈통 등록이 이루어져야 한다. 이와 같은 배경 하에서 경주개의 고유한 유전자원의 올바른

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-5979, Fax : +82-53-950-5955

E-mail : chogj@knu.ac.kr

보존을 위해 기초자료를 확보하고자 microsatellite DNA 다형성과 혈통확인에 관한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시 재료

경주지방에서 사육중인 경주개(동경이) 51두로부터 채혈한 혈액에서 Tozaki 등[16]의 방법에 준하여 DNA를 분리하였다.

Marker 선정 및 PCR

Microsatellite DNA형 분석을 위한 좌위는 국제표준항목이 포함된 StockMarks (Applied Biosystems, USA)에서 증폭이 용이하고 다형성이 높은 8개를 선정(Table 1)하여 manufacturer의 protocol에 따라 DNA를 GeneAmp PCR system 2720 (Applied Biosystems, USA)으로 증폭하였다. 사용된 primer는 multiplex-PCR을 수행하였으며 PCR과정은 다음과 같다. 먼저 95°C에서 10분간 가열하여 변성을 유도하고, 95°C에서 30초간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing 그리고 72°C에서 1분간 extension의 3단계를 총 20회한 후, 95°C에서 30초간 denaturation, 56°C에서 30초간 annealing 그리고 72°C에서 1분간 extension의 3단계를 총 15회 반복하였으며 마지막으로 72°C에서 30분간 final extension 과정을

거쳤다. 증폭된 DNA는 2.5% agarose gel로 전기영동하여 증폭산물을 확인하였다.

Microsatellite DNA 다형 분석

증폭된 DNA는 D.W와 1:5로 희석한 후 희석액 1 µl, Hi-Di formamide 11.5 µl와 GeneScan-500 LIZ size standard (Applied Biosystems, USA) 0.5 µl를 혼합한 후 95°C에서 3분간 denaturation과 ice에서 3분 동안 침지한 다음, 유전자형 자동분석기(ABI PRISM 3130 Analyzer, Applied Biosystems, USA)에 의해 전기영동하고, 검출된 각 유전자좌위의 대립유전자는 GeneMapper Software Version 4.0 (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 2005/2006년 국제동물유전학회(ISAG) 개 비교동정시험(Canine Comparison Test) 결과를 표준으로 각 marker별 대립유전자의 크기(bp)를 결정하였다.

통계 및 혈통 분석

Microsatellite DNA형 유전자좌위별 대립유전자의 출현빈도를 추정하고 이를 토대로 Heterozygosity (Het)와 Polymorphic information contents (PIC)를 CERVUS Ver.2.0 program (Version 1.0, The University of Edinburgh, 1988; <http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/cervus/>) [14]을 이용하여 산출하였고, 멘델의 유전양식에 따라 동경이의 혈통을 분석하였다.

Table 1. Characteristics of the 8 microsatellite loci used in this study

Marker	Primer sequences (5'→3')	Allele size range (bp)
PEZ3	(NED)-CACTTCTCATACCAGACTC CAATATGTCAACTATACTTC	95-154
PEZ5	(JOE)-GCTATCTTGTTCACAGC TCACTGTATAACAACATTGTC	97-121
PEZ6	(NED)-ATGAGCACTGGGTGTTATAC ACACAATTGCATTGTCAAAC	164-214
PEZ8	(NED)-TATCGACTTTATCACTGTGG ATGGAGCCTCATGTCTCATC	222-260
PEZ12	(JOE)-GTAGATTAGATCTCAGGCAG TAGGTCCTGGTAGGGTGTGG	250-320
FHC2010	(FAM)-AAATGGAACAGTTGAGCATGC CCCCTTACAGCTTCATTTTCC	210-260
FHC2054	(FAM)-GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC	140-183
FHC2097	(NED)-CAGCCGAGCACATGGTTT ATTGATTCIGATATGCCAGC	263-299

결과 및 고찰

Microsatellite DNA 다형 분석

동경이의 microsatellite DNA형을 분석한 결과는 Table 2와 3에서 보는 바와 같다. 대립유전자 수는 4~12개(평균 8.5개)로 검출되었으며 Expected heterozygosity와 PIC는 각각 0.6162~0.8746(평균 0.7587)와 0.5461~0.8512(평균 0.7167)으로 나타났고 이들 marker중에서 PEZ3, PEZ6, PEZ12, FHC2054 marker는 PIC가 0.7이상으로서 향후 동경이의 개체식별 및 친자확인에 활용 시 감정효율이 높을 것으로 생각된다. 국내에서 Ji 등[10]은 22개 ISAG microsatellite marker를 이용하여 Beagle dog 7두를 대상으로 친자확인을 보고한 바 있고, Cho 등[3]은 17개 ISAG marker를 이용하여 치와와, 풍산개, 래브라도 리트리버의 친자확인을 위한 microsatellite DNA 다형성을 분석하여 보고한 바 있다.

최근 들어 국제 간 개의 진화와 기원에 관한 연구[7,8]가 활발히 수행되고 있으며 이들의 혈통관리 및 보존을 위한 분자 유전학적인 연구가 병행되어 유전적인 특성의 규명은 물론이거니와 계통유전학적인 분석을 통한 타 종간의 유연관계도 밝혀나가고 있다[15]. 개 품종 분화의 시점이 인류와 개의 공동생활이 시작된 1만년 전 중석기시대로 추정되어 왔으

Table 2. Allele frequency, Heterozygosity and PIC of the 8 microsatellite markers in 51 Dongkyung-i

Marker	Allele (Gene frequency)				No. of alleles	OHet**	EHet	PIC
PEZ3	116* (0.1000)	120 (0.1200)	122 (0.1300)	126 (0.1000)	8	0.6000	0.8370	0.8077
	128 (0.2800)	132 (0.2000)	138 (0.0200)	140 (0.0200)				
PEZ5	99 (0.0900)	103 (0.3100)	107 (0.5300)	111 (0.0700)	4	0.4800	0.6162	0.5461
PEZ6	167 (0.0109)	171 (0.0435)	173 (0.0217)	175 (0.1630)	12	0.9565	0.8746	0.8512
	177 (0.0978)	179 (0.1630)	181 (0.2283)	183 (0.0870)				
	187 (0.0652)	189 (0.0217)	191 (0.0326)	195 (0.0652)				
PEZ8	130 (0.0102)	136 (0.0102)	226 (0.0408)	230 (0.1531)	12	0.6735	0.6916	0.6590
	234 (0.0612)	236 (0.0102)	238 (0.5204)	242 (0.1122)				
	246 (0.0102)	248 (0.0102)	250 (0.0510)	256 (0.0102)				
PEZ12	261 (0.0208)	265 (0.0833)	269 (0.2292)	273 (0.2813)	11	0.7708	0.8243	0.7918
	277 (0.2709)	281 (0.0313)	283 (0.0208)	285 (0.0104)				
	287 (0.0208)	291 (0.0208)	301 (0.0104)					
FHC2010	225 (0.1837)	229 (0.4388)	233 (0.2143)	237 (0.1633)	4	0.7347	0.7084	0.6529
FHC2054	147 (0.0100)	151 (0.1600)	155 (0.1500)	157 (0.0100)	10	0.8600	0.8386	0.8094
	159 (0.2800)	163 (0.0600)	167 (0.0500)	171 (0.1500)				
	175 (0.1200)	177 (0.0100)						
FHC2079	269 (0.0306)	271 (0.3469)	273 (0.0408)	281 (0.0204)	7	0.7551	0.6687	0.6158
	275 (0.4388)	277 (0.1122)	279 (0.0102)					
Mean					8.5	0.7288	0.7587	0.7167

*Size (bp) of all loci are identical to the assignments from the 2005/2006 ISAG Canine Comparison Test.

**OHet: Observed heterozygosity, EHet: Expected heterozygosity, PIC: Polymorphic information contents.

나 Vila 등[17]은 mitochondrial DNA의 loop region에 대한 염기서열 분석을 이용하여 전 세계 27개 지역의 162마리 늑대와 67개 품종의 개 140두를 비교해 본 결과 10만년 이상 전에 전종분화가 이루어졌으며 그 이후에도 지속적으로 늑대의 유전형질이 유입된 흔적이 있다고 보고한 바 있다. Girman 등[6]은 아프리카 야생개의 분화 및 기원에 관한 연구를 위해 야생개들의 mitochondria 내 cytochrome b 유전자 비교분석을 통하여 이들이 wolf-like canids와 같은 계통임을 증명한 바 있으나 mitochondria 계통의 분석은 여러 종의 계통분석에 유용한 기법이지만 DNA의 재조합 없이 모계 유전되므로 집단 내의 gene flow나 hybridization에 관해서 설명하기에는 부족한 것으로 보고한 바 있다. 경주지방에 사육

되고 있는 동경이의 올바른 혈통을 확인하고 정립하기 위해서는 mtDNA에 관한 연구는 물론 더 많은 갯수의 microsatellite marker에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

혈통 분석

Table 3과 Fig. 1에서는 공시재료 51두 중 사육가에 의해 혈통이 알려진 5두를 대상으로 microsatellite marker를 이용하여 혈통을 분석한 결과이다. Puppy 1, 2, 3은 아버지는 사망하여 알 수 없으나 어머니만 알고 있는 경우로서 puppy 1과 2는 8개 marker 모두에서 멘델의 유전법칙에 부합되어 dam 1의 자손이 될 가능성이 있으나 puppy 3은 FHC2010,

Table 3. The results of pedigree verification in 5 Dongkyung-i

Pedigree	PEZ3	PEZ5	PEZ6	PEZ8	PEZ12	FHC2010	FHC2054	FHC2079	Comments
Dam 1	116/132	103/107	181/183	238/238	269/277	225/233	151/159	275/275	
Puppy 1	116/122	107/107	175/181	230/238	269/277	229/233	159/167	271/275	Inclusion
Puppy 2	122/132	103/107	177/181	234/238	269/277	225/229	159/167	271/275	
Puppy 3	122/132	107/107	183/187	238/250	265/269	229/237	155/171	271/271	Exclusion
Sire 2	120/132	107/107	173/179	234/238	269/273	229/229	155/155	271/275	
Dam 2	122/132	99/107	179/181	238/238	265/269	225/229	155/159	271/275	
Puppy 4	132/132	107/107	179/181	238/242	269/269	225/229	155/157	269/275	Exclusion
Puppy 5	132/132	107/107	173/181	234/242	269/273	225/229	155/155	269/275	

요 약

경주지방에서 사육 중인 경주개(동경이) 51두를 대상으로 8개의 microsatellite marker를 이용하여 DNA형을 분석한 결과 대립 유전자 수는 4~12개(평균 8.5개)로 검출되었으며 Expected heterozygosity와 PIC는 각각 0.6162~0.8746(평균 0.7587)와 0.5461~0.8512(평균 0.7167)으로 나타났고, PEZ3, PEZ6, PEZ12, FHC2054 marker는 PIC가 0.7이상으로 나타났다. 이들 marker는 향후 동경이의 개체식별 및 친자확인에 유용하게 쓰일 수 있다. 공시재료 51두 중 사육가에 의해 혈통이 알려진 5두를 대상으로 microsatellite marker를 이용하여 혈통을 분석한 결과 3두에서 현재 가계도와 일치하지 않았다. 따라서 앞으로 더 많은 연구를 통해서 동경이에 대한 체계적인 혈통 정립이 이루어져야 할 것이다.

References

1. Chae, Y. J., B. C. Lee and H. Lee. 1998. Paternity test in dogs by DNA analysis. *J. Vet. Clin.* **15**, 274-278.
2. Cho, G. J. and B. W. Cho. 2006. Physical characteristics and microsatellite polymorphisms in Miryang native dogs. *J. life Sci.* **16**, 626-631.
3. Cho, G. J., B. W. Cho, S. K. Kim, K. W. Lee and Y. K. Kim. 2003. Analysis of microsatellite DNA polymorphism for parentage testing in dog breeds. *J. Anim. Sci & Technol. (Kor)* **45**, 191-198.
4. Cho, S. J., O. J. Kim, H. J. Park, S. G. Choi, M. G. Min, B. S. Kim, Y. S. Park and B. J. Cho. 2006. Historical and morphological investigation on Korean native Dongkyung-i dogs. *Korean J. Companion Anim. Sci.* **3**, 45-53.
5. Denise, S., E. Johnston, J. Halverson, K. Marshall, D. Rosenfeld, S. Mckenna, T. Sharp and J. Edwards. 2004. Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Anim. Genet.* **35**, 14-17.
6. Girman, D. J., P. W. Kat, J. R. Ginsberg, M. G. Mills, M. Borner, V. Wilson, J. H. Fanshawe, C. Fitzgibbon, L. M. Lau and R. K. Wayne. 1993. Molecular genetic and morphological analyses of the African wild dog (*Lycaon pictus*). *J. heredity* **84**, 450-459.
7. Ha, J. H., S. E. Lee, Y. B. Tak and J. B. Kim. 1998. The physical characteristics and blood proteins of Korean native dogs. *Korean J. Anim. Sci.* **40**, 711-720.
8. Ha, J. H. and K. S. Kim. 1998. A review on the origin of Korean native dogs. *Korean J. Anim. Sci.* **40**, 701-710.
9. Halverson, J. L. and J. W. Edwards. 2000. Microsatellite polymorphism in dog breeds-the AKC Parent Club study. pp. 19, 27th eds., ISAG Conf. *Anim. Genet.*
10. Ji, H. J., E. H. Kim, K. K. Lee, T. Y. Kang, J. M. Lee, H. D. Shin, L. H. Kim and Y. M. Yun. 2007. Beagle dogs parentage testing by using 22 ISAG microsatellite markers.

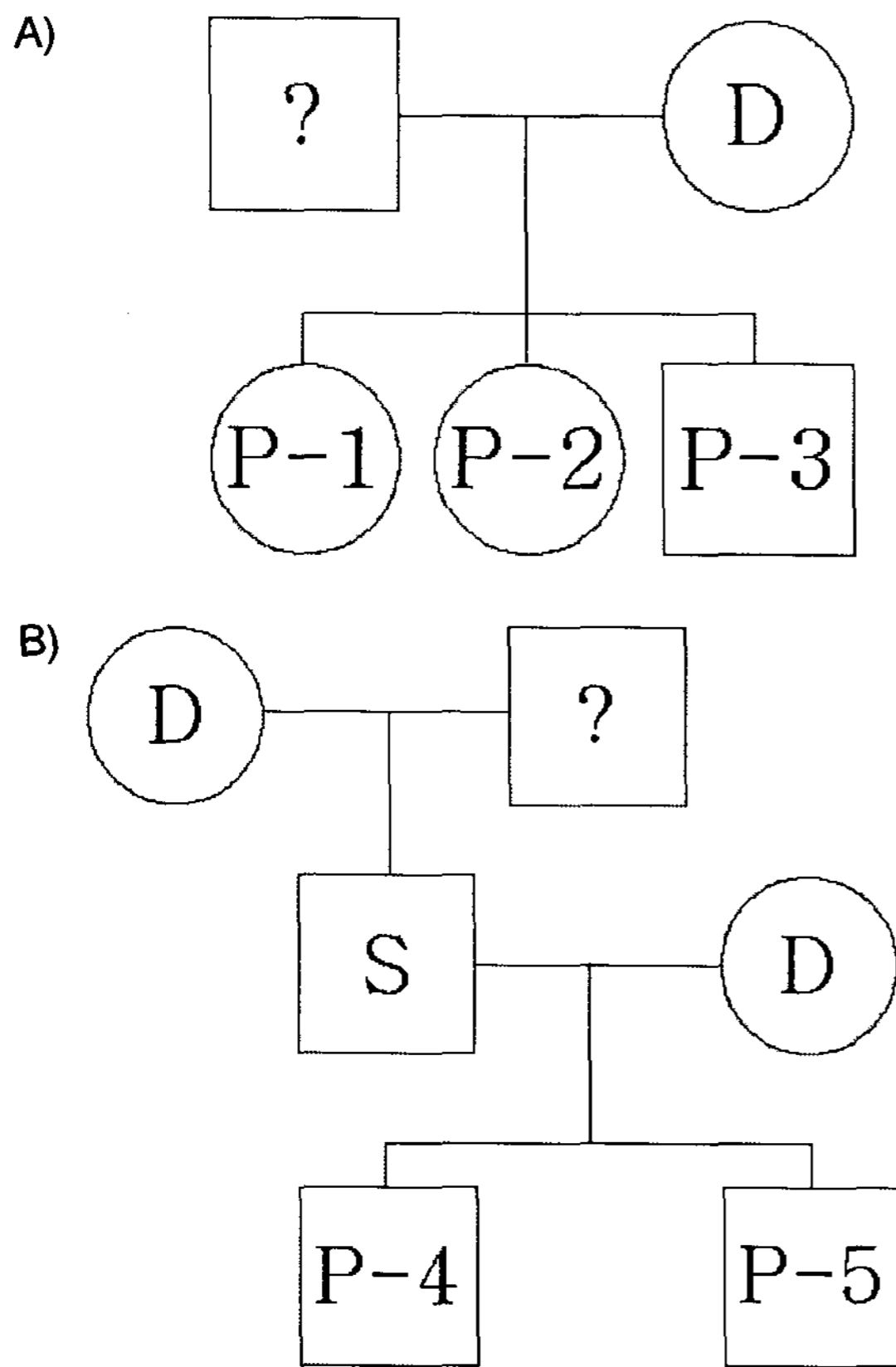


Fig. 1. Pedigree verification case of Dongkyung-i family. A) As shown in Table 3, P-1 and P-2 are included as puppy of dam by all loci, but P-3 is excluded as puppy of dam by marker FHC2010, FHC2054 and FHC2079. B) P-4 and P-5 are excluded as puppy of sire and dam by marker PEZ8, FHC2054 and FHC2079.

FHC2054, FHC2079 marker에서 멘델의 유전양식과 상이하 여 dam 1의 자손으로서 배제되었고, 마찬가지로 puppy 4와 5도 PEZ8, FHC2054, FHC2079 marker에서 멘델의 유전양식 과 상이하 여 sire 2와 dam 2의 자손이 될 수 없음을 알 수 있었다.

한국 토종개 집단의 가계구성을 위한 연구는 주로 RFLP 와 mtDNA[13], RAPD[11], DNA fingerprinting[12], microsatellite marker[3] 등을 이용하여 분석되었지만, 동경이에 대한 유전학적 연구는 없는 실정이다. 사육농가에서 구전되어 내려오는 5두의 동경이에 대한 혈통을 microsatellite marker를 이용하여 분석해 본 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 2두의 강아지에서만 친자 가능성을 확인하였다. 현재 동경이에 관한 연구는 외견상 동경이의 특성(꼬리)에 따라 엄격히 심사하여 51두를 우선 선발하였다. 그러나 본 연구를 통해 동경이의 혈통을 확립하기 위해서는 번식도 중요하지만 정확한 혈통관리가 우선되어야 하며, 그렇게 하기 위해서는 무엇보다 유전학적 연구를 통한 체계적인 혈통정립이 선행되어야 할 것이다.

- Korean J. Vet. Res.* **47**, 457-460.
11. Jeong, H. W., K. S. Kim and J. H. Ha. 1997. Analysis of phylogenetic relationships among the Asian 8 dog breeds (*Canis familiaris*) through Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Korean J. Genet.* **19**, 143-149.
 12. Lee, S. L., H. S. Lee, W. B. Chung, R. B. Tak, H. C. Park, J. B. Kim and J. H. Ha. 1991. Selection of the useful DNA probe for the pedigree analysis of Korean dog breed, Sapsarees. *Korean J. Genet.* **13**, 247-254.
 13. Lee, S. U., S. Y. Hong and J. H. Ha. 1995. The pedigree analysis of Korean native dog, Sapsaree by mitochondrial and RFLP. *Korean J. Genet.* **17**, 17-24.
 14. Marshall, T. C., J. Slate, L. Kruuk and J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* **7**, 639-655.
 15. Tanabe, Y. and K. Ota. 1991. Biochemical-genetic relationships among asian, european dogs and the ancestry of the Japanese native dog. *J. Anim. Breed Genet.* **108**, 455-478.
 16. Tozaki, T., H. Kako, S. Mashima, K. I. Hirota, T. Hasegawa, N. Ishida, N. Miura, N. H. Choi-Miura and M. Tomita. 2001. Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. *J. Vet. Med. Sci.* **63**, 1191-1197.
 17. Vila, C., P. Savolainen, J. E. Maldonado, I. R. Amorim, J. E. Rice, R. L. Honeycutt, K. A. Crandall, J. Lundeberg and R. K. Wayne. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science* **276**, 1687-1689.